

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08780

研究課題名(和文)細胞内共生microbiomeからみた新規膵癌進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Intracellular bacterium *Fusobacterium nucleatum* progresses pancreatic cancer through autocrine and paracrine manners

研究代表者

江口 大樹 (EGUCHI, Daiki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90726390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)："Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)" は細胞内に侵入することができる歯周病菌の一種であり、膵臓がんに着し、患者の予後に影響を与える可能性がある。腫瘍内の "F. nucleatum" は、腫瘍細胞からのCXCL1の分泌を促進し、膵臓がんの進展を促進させることを示した。次に "F. nucleatum" によってCXCL1-CXCR2軸が活性化され、免疫抑制性の腫瘍微小環境が形成され、この軸の阻害により腫瘍の成長が抑制されることをin vivo実験で明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内の "Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)" が腫瘍微小環境を改変し腫瘍成長を促進させることを多数のin vivo実験で初めて示した。口腔内細菌叢と膵臓がん細菌叢の関連は明らかにされていないが、膵臓腫瘍内の一部の細菌は十二指腸から発生することが知られており、マウスに経口摂取で投与された細菌が膵臓に移行し、腫瘍内のKi67陽性細胞を活性化することが示されている。口腔細菌叢は部分的に膵臓内の微生物叢を表していると考えられ、膵臓がん内の細菌が悪性腫瘍に影響を与えることを考慮すると、口腔細菌叢の解析が膵臓がんの新たな治療法の開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)："Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)" can colonize pancreatic cancer and affect the prognosis of pancreatic cancer patients. Intratumor "F. nucleatum" promotes CXCL1 secretion from cancer cells, contributing to cancer progression in an autocrine and paracrine manners. The CXCL1-CXCR2 axis is activated by "F. nucleatum" to create an immunosuppressive tumor microenvironment, and blockade of this axis suppresses tumor growth.

研究分野：医歯薬学

キーワード：microbiome 細菌叢 腫瘍内細菌 Fusobacterium nucleatum CXCL1 CXCR2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌の癌死亡率は本邦において第4位であり、年次推移でも増加傾向にある。5年生存率は、9%(Siegel, *Cancer statistics*, 2020)とまだ大きな改善は見られない。その原因として膵癌に特徴的な癌微小環境との癌間質相互作用が挙げられ、我々の研究室では、膵癌の間質の増生が、癌間質相互作用を通して膵癌の抗癌剤抵抗性に大きな影響を及ぼすことを多数報告してきた(Ohuchida, *Cancer Research*, 2004; Ikenaga, *Gastroenterology*, 2010; Kozono, *Cancer Research*, 2013; Endo, *Gastroenterology*, 2017)。一方で近年、Fusobacterium(歯周病の原因とされるグラム陰性嫌気性桿菌)などの口腔内常在菌が膵癌発症のリスクに関わること(Fan, *Gut*, 2018)や、これまで無菌の臓器と考えられてきた膵組織内、膵腫瘍内にもmicrobiomeが存在し、免疫寛容の誘導を介して膵癌の進展を促進していること(Pushalcar, *Cancer Discov*, 2018)が報告されている。特に膵腫瘍内は細菌量が多く、化学療法抵抗性の原因となっていることが明らかになった(Geller, *Science*, 2017)。腫瘍細胞の間質に存在すると考えられていた腫瘍内microbiomeは、腫瘍細胞内で生きて存在し、癌特有のmicrobiomeを形成していることが報告された(Nejman, *Science*, 2020)。細胞内へ侵入したmicrobiomeはゼノファジー(選択的オートファジー)により、捕獲、分解されると認識していたため、細胞内に生きた細菌が存在することは、事実として受け入れがたい驚くべき報告であった。大腸癌領域では細菌が腫瘍細胞内に侵入し、腫瘍細胞の遊走能を促進させること(Casasanta, *Sci Signaling*, 2020)が報告されているが、細胞内microbiomeが与える膵癌進展のメカニズムは解明されていない。今後、このメカニズムが解明されれば、既存の癌治療のパラダイムを大きく変える可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍細胞内に存在するmicrobiomeが腫瘍細胞のbiologyに影響を与えている可能性を考慮し、細胞内共生microbiomeに着目した癌の進展メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

ア. 腫瘍内および細胞内共生microbiomeの存在の確認

ヒト膵癌組織を用いて細菌の構成成分であるlipopolysaccharideの存在を免疫染色により同定する。また、蛍光標識した細菌が膵癌細胞株に取り込まれることをTime Lapse imagingをもちいて撮影する。

イ. 膵癌細胞内共生microbiomeの同定

ステップ1で抽出されたDNAを用いて細菌特有の16S rRNA領域プライマーによるPCRで増幅させ、NGSによるメタゲノム解析を行い、膵癌細胞内共生microbiomeを同定する。しかし、実際には膵癌組織内共生microbiomeは同定できたが、細胞内共生microbiomeのみの抽出はできなかった。そこで、細胞内に侵入することが報告されている特定の細菌に着目して実験を進めることにした。中でも、無菌の臓器と考えられてきた膵組織内、膵腫瘍内に存在し、膵癌発症のリスクとなる口腔内細菌の一種Fusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*)を用いた。

ウ. In vitroにおける細胞内共生microbiomeが与える膵癌進展のメカニズム解明

ヒト膵癌細胞株と*F. nucleatum*を共培養し、腫瘍細胞の遊走能・浸潤能の解析を行う。癌細胞と*F. nucleatum*の共培養の上清のサイトカインアレイを行い腫瘍細胞のbiologyの変化を調べる。

エ. 近交系マウスを用いた感染腫瘍細胞による膵癌進展・転移の評価

膵癌細胞株皮下移植マウスへ歯周病菌*F. nucleatum*を腫瘍内投与し、腫瘍径を評価したところ、他の歯周病菌投与群と比較する。腫瘍をフローサイトメトリーと免疫染色により免疫細胞の変化を調べる。また、サイトカインアレイで得られた特定のサイトカインの変化を確認し、サイトカインの薬理的・遺伝学的な阻害により腫瘍成長に変化が認められるかを確認する。

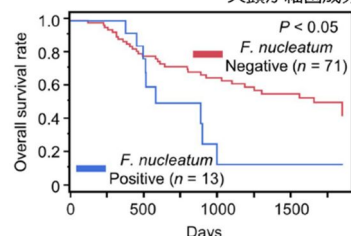
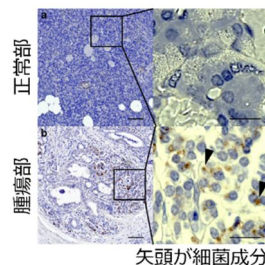
4. 研究成果

ア. 腫瘍内および細胞内共生microbiomeの存在の確認

ヒト膵癌組織を用いて細菌の構成成分であるLPSを抗LPS抗体による免疫組織化学染色検査で評価したところ、膵癌の約60例で腫瘍内細菌の存在を確認した(右図)。正常膵組織にはLPSは検出されなかった。蛍光標識した細菌が膵癌細胞株に取り込まれることをTime-Lapse imagingでリアルタイム撮影することに成功した。

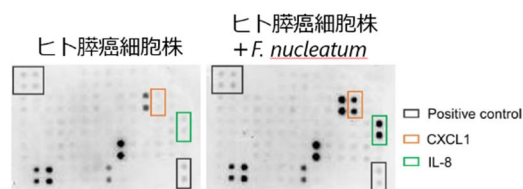
イ. 膵癌細胞内共生microbiomeの同定

細胞内に侵入することが報告されている特定の歯周病菌に着目し、ヒト膵癌組織のDNA抽出産物を用いて、PCRで増幅させたところ、歯周病菌であるFusobacterium nucleatum (*F. nucleatum*)由来のDNA検出群は非検出群と比較して、治療前の腫瘍サイズが大きく、膵後方浸潤の割合が高く、overall survival rateが短いことが判明した(右図)。



ウ．In vitro における細胞内共生 microbiome が与える膀胱癌進展のメカニズム解明

膀胱癌細胞株と *F. nucleatum* を共培養することで、膀胱癌細胞株の遊走能と浸潤能はともに増加した。これは、他の歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* では認められなかった。共培養の上清のサイトカインアレイを行い、CXCL1 が上昇していることが同定された（右図）。CXCL1 の受容体 CXCR2 に対する抗体を投与すると、遊走能・浸潤能は抑制された。

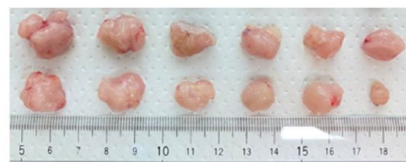


エ．近交系マウスを用いた感染腫瘍細胞による膀胱癌進展・転移の評価

膀胱癌細胞株皮下移植マウスへ歯周病菌 *F. nucleatum* を腫瘍内投与し、腫瘍径を評価したところ、他の歯周病菌投与群と比較して、*F. nucleatum* 投与群では有意に腫瘍の増大が得られた。サイトカインアレイにより同定された

CXCL1 の depletion 実験を行った。抗 CXCL1 抗体の投与、抗 CXCR2 抗体の投与のいずれにおいても腫瘍の増大が抑制されることにより確認できた（右図）。CXCL1 の増加により骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) が増加し、それにより

F. nucleatum



F. nucleatum
+ anti-CXCL1

腫瘍浸潤性 T 細胞の減少がみられることが知られている。*F. nucleatum* を腫瘍内投与のモデルにおいても腫瘍内で MDSC の増加と腫瘍浸潤性 T 細胞の減少がみられることが免疫染色とフローサイトメトリーにより確認された。さらに、MDSC の働きを制限するためにその表面マーカーである Ly6G に対する抗 Ly6G 抗体によっても腫瘍の増大が抑制されることを確認した。

以上の結果より、細胞内で共生しうる *F. nucleatum* が膀胱癌微小環境の改変を通して膀胱癌の進行を促進していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Masataka, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Luo Haizhen, Zhong PingShan, Date Satomi, Oyama Koki, Higashijima Nobuhiro, Kubo Akihiro, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Abe Toshiya, Yamada Yutaka, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 114
2. 論文標題 Intratumor Fusobacterium nucleatum promotes the progression of pancreatic cancer via the CXCL1 CXCR2 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3666 ~ 3678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15901	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 林昌孝, 池永直樹, 仲田興平, 中村雅史	4. 巻 44
2. 論文標題 腸内細菌を応用した膵癌治療法	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 277-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masataka Hayashi, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Haizhen Luo, PingShan Zhong, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Satomi Date, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 BIOLOGICAL EFFECTS OF INTRATUMOR PERIODONTAL PATHOGENS IN PANCREATIC CANCER
3. 学会等名 54th Annual American Pancreatic Association Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masataka Hayashi
2. 発表標題 INTRATUMOR FUSOBACTERIUM NUCLEATUM PROMOTES THE PROGRESSION OF PANCREATIC CANCER VIA THE CXCL1/IL-8-CXCR2 AXIS
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 隆晴 (YASUI Takaharu) (60611283)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	森山 大樹 (MORIYAMA Taiki) (70586859)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	林 昌孝 (HAYASHI Masataka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------